

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1899-1900.

N° 1.

ACTION

DE LA

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR LES HYDRATES DE CARBONE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE PHARMACIEN DE 2^e CLASSE

Présentée et soutenue le

1900

PAR

M^{LLE} LOUISE NAPIAS

*Lauréat de l'École supérieure de pharmacie de Paris (Médaille d'argent. Prix Buignet).
Ex-préparateur de chimie à l'école Vauquelin.*

JURY

{ MM. BOURQUELOT, Président.
VILLIERS-MORIAMÉ, Professeur
GRIMBERT, Agrégé.

SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1900

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1899-1900.

N° 1.

ACTION

DE LA

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR LES HYDRATES DE CARBONE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE PHARMACIEN DE 2^e CLASSE

Présentée et soutenue le

1900

PAR

M^{LE} LOUISE NAPIAS

Lauréat de l'École supérieure de pharmacie de Paris (Médaille d'argent. Prix Buignet).

Ex-préparateur de chimie à l'école Vauquelin.



MM. BOURQUELOT, Président.
VILLIERS-MORIAMÉ, Professeur
GRIMBERT, Agrégé.

SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHAÎRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1900

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. G. PLANCHON, Directeur, O *, Q I.

A. MILNE-EDWARDS, Assesseur, Membre de l'Institut, C *, Q I.

É. MADOUË, Secrétaire, Q I.

PROFESSEUR

MM. PLANCHON, O *, Q I. . . . Matière médicale.

A. MILNE-EDWARDS, Membre
de l'Institut, C *, Q I. . . . Zoologie.

JUNGFLEISCH, *, Q I. . . . Chimie organique.

LE ROUX, O *, Q I. . . . Physique.

BOUCHARDAT, *, Q I. . . . Hydrologie et Minéralogie.

PRUNIER, Q I. . . . Pharmacie chimique.

MOISSAN, Membre de l'Institut,
O *, Q I. . . . Chimie minérale.

GUIGNARD, Membre de l'Insti-
tut, *, Q I. . . . Botanique générale.

VILLIERS-MORIAME, Q I. . . . Chimie analytique.

BOURQUELOT, Q I. . . . Pharmacie galénique.

GAUTIER, Q A. . . . Toxicologie.

N. . . . Cryptogamie.

Directeur et professeur honoraire : M. CHATIN, Membre de l'Institut, O *, Q I.

Professeurs honoraires : { MM. BERTHELOT, Membre de l'Institut, G C *, Q I.
MARCHAND, Q I.; RICHE, O *, Q I.

AGRÈGÉS EN EXERCICE

MM. BERTHELOT, Q A.

OUVRARD, Q I.

RADAIS, Q A.

LEBEAU, Q A.

MM. MOUREU.

COUTIERE.

GRIMBERT.

PERROT, Q A.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. GUERBET. . . . Chimie générale.

LEXTREIT, Q I. . . . Chimie analytique.

GUÉRIN, Q A. . . . Micrographie.

QUESNEVILLE, Q I. . . . Physique.

LUTZ Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. CHASTAING, Q I.

Bibliothécaire : M. DORVEAUX, Q I.

A M. E. DÜCLAUX

Directeur de l'Institut Pasteur.

A M. LE D^r ÉMILE ROUX

Sous-directeur de l'Institut Pasteur.

Témoignage de sincère reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550211_0073

ACTION

DE LA

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR LES HYDRATES DE CARBONE

PAR

M^{LLE} LOUISE NAPIAS

INTRODUCTION

La chimie des infiniment petits constitue aujourd'hui le chapitre le plus important de la chimie biologique, et les notions qu'elle fournit dominent et éclairent la physiologie tout entière.

La vie d'un être n'est, en effet, que la résultante des vies individuelles des cellules qui le constituent ; pour comprendre le fonctionnement d'un mécanisme complexe, il faut savoir comment fonctionne chaque rouage isolé : avant d'aborder la physiologie de l'être, il faut connaître la physiologie de la cellule.

Les éléments anatomiques des tissus sont différenciés en vue du rôle qu'ils jouent dans l'être, et leurs aptitudes fonctionnelles sont restreintes ; pour vivre, ils ne peuvent s'accommoder que de conditions extrêmement étroites, presque toujours impossibles à réaliser en dehors de l'organisme même auquel ils appartiennent. La vie de pareils éléments ne peut être isolée de la vie de l'ensemble ; ils se prêtent donc mal aux nécessités de l'expérience.

Les microbes, au contraire, sont des cellules isolées, organisées pour vivre seules, peu délicates, et vivant très bien dans les milieux artificiels que nous savons leur composer ; ils constituent donc un merveilleux instrument pour l'étude du chimisme cellulaire, instrument d'autant plus précieux que, d'un bout à l'autre de l'échelle des êtres, les phénomènes d'assimilation et de désassimilation sont le résultat d'actions physico-chimiques dont les lois sont indépendantes de l'appareil spécial, de la cellule particulière au sein desquels ils s'accomplissent : le globule de levure et la cellule de nos muscles vivent de la même manière.

Pour un grand nombre de microbes, l'intérêt scientifique de leur étude s'est tout de suite doublé d'un intérêt pratique : la

physiologie mieux connue des ferments industriels a régénéré l'industrie des fermentations ; celle des ferments de l'azote est à la veille de régénérer l'agriculture. C'est de ce côté que l'intérêt pratique a surtout fait naître les travaux, et la plupart des renseignements que nous possédons sur la chimie des infiniment petits ont été acquis à l'occasion de recherches entreprises en vue d'applications industrielles ou agricoles.

Dès le début des études bactériologiques, les microbes pathogènes ont très vivement sollicité l'attention des savants, mais celle-ci s'est concentrée sur l'observation des phases de la lutte qui s'établit entre eux et l'organisme envahi, et sur la recherche des moyens propres à venir immédiatement en aide à celui-ci.

La nécessité d'une étude des propriétés chimiques de ces microbes n'est donc pas apparue tout d'abord ; mais, aujourd'hui, une évolution se produit : aux études chimiques, on va demander les caractères biologiques qui permettent de définir avec précision chaque ferment, et de différencier entre elles des races très voisines, comme le bacille typhique et le *bacterium coli*.

De nombreux travaux (1) ont montré l'influence qu'exerce, sur la production des toxines, la nature des substances présentes dans le liquide de culture, et sur lesquelles le microbe peut agir ; ces notions ont une importance considérable, non seulement au point de vue pratique de la préparation des toxines *in vitro*, mais encore au point de vue de l'interprétation du mécanisme de leur production au sein de l'être vivant. Il y a là une voie encore toute inexplorée, mais qui semble appelée à devenir une des branches les plus fécondes de la chimie pathologique.

Deux travaux, l'un de M. Roger (2), l'autre de M. Marmier (3), marquent une première étape dans cette voie : ces auteurs ont constaté que la bactériodie charbonneuse détruit le glycogène *in vitro* et que, parallèlement, le glycogène disparaît du foie des animaux qui succombent à l'infection charbonneuse. De telles données sont certainement de nature à faciliter la compréhension de la physiologie de cette infection. Nous montrons nous-même, à la fin de ce travail, qu'il paraît exister une relation étroite entre les qualités fermentatives du microbe et sa virulence.

Nous pensons que cet exposé suffit pour montrer l'intérêt

qui s'attache aux recherches de l'ordre de celles qui font l'objet de notre travail.

C'est M. le Dr E. Roux qui a bien voulu nous indiquer ce sujet; il nous a accueilli dans son laboratoire et nous a toujours soutenue de ses bienveillants conseils; nous lui en exprimons ici toute notre reconnaissance.

II

FERMENTATION DES HYDRATES DE CARBONÉ

L'action de la bactériidie charbonneuse sur la matière amy-lacée a été peu étudiée; en dehors des travaux déjà cités, relatifs à son action sur le glycogène, il n'existe, à notre connaissance, que deux autres travaux : l'un de l'abbé Maumus, l'autre de M. J. Noé.

L'abbé Maumus (4) a cultivé la bactériidie :

1^o Sur pomme de terre ;

2^o Sur empois de fécule de pomme de terre.

Les résultats les plus nets, et aussi les plus intéressants, sont ceux qu'il a obtenus dans le second cas, avec l'empois :

48 heures après l'ensemencement, l'empois était entièrement liquéfié et l'essai à la liqueur de Fehling indiquait qu'il s'était déjà formé du sucre; après 4 jours, le liquide contenait encore du sucre réducteur, mais ne se colorait plus en bleu par l'iode et, par conséquent, ne contenait plus d'amidon. Après 6 ou 7 jours, le sucre avait totalement disparu.

Ces résultats ne sont pas absolument en accord avec les nôtres, mais les différences sont d'ordre secondaire et peuvent tenir à la diversité des races de bactériidie ou aux méthodes de culture.

Les points essentiels établis par l'abbé Maumus sont :

1^o La bactériidie charbonneuse liquéfie l'amidon et le transforme en sucre;

2^o Elle consomme le sucre ainsi formé.

M. J. Noé (5) a trouvé des résultats un peu différents avec

Inuline : l'inuline est saccharifiée, transformée en lévulose, mais celui-ci ne serait pas attaqué.

A vrai dire, il ressort seulement des expériences de M. Noé que le lévulose n'est pas détruit entièrement dans les limites de l'expérience, et que le liquide conserve jusqu'au bout la propriété de réduire la liqueur cupro-potassique.

On n'a pas été plus loin, et on n'a pas recherché quels étaient les produits qui prenaient naissance aux dépens de l'amidon; ou mieux, du sucre.

C'est cette étude que nous avons entreprise.

Nous avons commencé par répéter les expériences de l'abbé Maumus, en ensemençant la bactériodie sur de l'empois de fécule.

Mais, afin de donner au microbe une quantité d'azote permettant une culture plus abondante, et, par conséquent, une destruction d'une quantité plus grande d'hydrates de carbone, nous avons gélifié la fécule dans du bouillon de veau neutre et peptonisé à 1 0/0.

Pour obtenir des empois bien homogènes, et sur lesquels la liquéfaction marche d'une façon régulière, il est nécessaire de prendre quelques précautions : 150 c. c. de bouillon étaient introduits dans des fioles à fond très plat, au fond desquelles ils occupaient une épaisseur maximum de 1/2 centimètre; on y ajoutait 7 gr. 5 d'amidon de pomme de terre, et on agitait. Puis, les fioles, bouchées au coton, étaient plongées dans l'eau bouillante, et agitées continuellement; dès que la température du bouillon était suffisamment élevée, l'amidon se gélifiait, donnant un empois parfaitement homogène. On maintenait les fioles une demi-heure à 100°, pour laisser échapper les bulles d'air qui restaient emprisonnées dans l'empois; on stérilisait alors à l'autoclave, par chauffage d'une demi-heure à 120°, en ayant soin de n'élever la température que très lentement.

Si on opère sans ces précautions, on n'obtient que des empois grumeleux et, pendant la stérilisation, le coton qui bouche les fioles est presque toujours projeté.

Les fioles ainsi préparées étaient ensemençées, puis mises à l'étuve à 35°.

Au bout de quelques heures, on voyait la liquéfaction commencer autour des points où était tombée la semence; après 1 jour ou 2, elle était toujours complète.

Déjà 12 heures après l'ensemencement, alors qu'une grande partie de l'amidon est encore non liquéfiée, l'essai à la liqueur de Fehling indique la présence d'une assez forte proportion de sucre réducteur; nous ne nous sommes pas préoccupé de rechercher la nature du sucre formé, parce que cette question avait été tranchée par M. A. Fernbach au cours d'expériences inédites qu'il a bien voulu nous communiquer, et que nous rapporterons plus loin.

M. A. Fernbach a trouvé que, dès les premières 12 heures de culture, il y avait formation de glucose et de maltose.

Pendant les premiers jours, la proportion du sucre réducteur, que nous évaluons globalement en glucose, va en augmentant :

Sucre pour 100 c. c. de culture :

Après 12 heures.....	traces
Après 24 —	0 ^{gr} ,2
Après 48 —	0 ^{gr} ,8

En même temps on constate que le liquide devient acide, et cette acidité augmente pendant les premiers jours. Dans le tableau ci-dessous, l'acidité totale est évaluée en acide acétique :

Acidité totale après 24 heures.....	0 ^{gr} ,20
— — — 40 —	0 ^{gr} ,26
— — — 5 jours.....	0 ^{gr} ,35

Dans l'acide ainsi formé, nous avons recherché les acides volatils par la méthode des distillations fractionnées indiquée par M. E. Duclaux (6).

Les nombres fournis correspondent à de l'acide acétique à peu près pur, mais celui-ci ne représente qu'une partie de l'acidité totale évaluée directement.

Il y a donc, dès le début de la culture, formation d'un acide fixe et d'un acide volatil.

Pour rechercher la nature de ces acides, il fallait en avoir des quantités notables; dans nos cultures, leur formation s'est très vite arrêtée.

Nous avons pensé que l'acidité croissante du milieu gênait le développement de la bactériodie, et nous avons repris nos

expériences en ajoutant à l'empois d'amidon une quantité de craie suffisante pour saturer l'acide au fur et à mesure de sa formation.

Le carbonate de calcium était intimement mélangé à la fécule, et la poudre était introduite dans les fioles de bouillon :

Bouillon de veau	450 c. c.
Fécule.....	7 ^{gr} ,5
Co ² Ca	2 ^{gr} ,5

En opérant comme nous l'avons indiqué ci-dessus, on obtient des empois homogènes, dans lesquels le carbonate de calcium est réparti uniformément.

On aensemencé comme précédemment et mis à l'étuve à 35°.

Après un temps de culture déterminé, la fiole était enlevée de l'étuve; on tuait les bactériidies par un chauffage de un quart d'heure à 100° et on filtrait. Le liquide filtré, additionné des eaux de lavage du résidu, était concentré; une partie de ce liquide servait au dosage de la chaux totale en solution, une autre partie à la recherche des acides volatils.

Pour doser la chaux, nous avons précipité par l'oxalate d'ammonium et l'ammoniaque; le précipité, lavé à l'eau distillée bouillante et séché, était pesé et compté comme $(C^2 O^4)^2 Ca, H^2 O$.

Pour la recherche qualitative et quantitative des acides volatils, nous avons toujours employé la méthode de M. Duclaux.

Bactéridie sporogène virulente et amidon. — Une série de fioles, ensemencées avec une bactériidie virulente, a été cultivée à 35° et étudiée au bout de temps variables.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus : les nombres inscrits dans la colonne « acide fixe » représentent, évalué en acide lactique, l'acide nécessaire pour saturer la chaux dissoute, abstraction faite de celle qui est unie à l'acide volatil.

DURÉE de la culture	ESSAI A LA LIQUEUR DE Fehling.	ESSAI A L'IODE	ACIDE FIXE (valeur en acide lactique)	ACIDE VOLATIL (valeur en acide acétique)	NATURE de l'acide volatil.
7 jours	Réduction	Coloration bleue	4,87	0,73	Acide acétique
9 —	0,80 de glucose pour toute la culture.	— —	3,21	1,15	— —
22 —	pas de réduction	— —	2,59	1,78	—
71 —	—	— —	traces	0,13	— —
85 —	—	— —	0	0,86	— —
197 —	—	pas de coloration	0	0,12	— formique

Nous voyons donc, d'après ce tableau, que, dès le début de la culture, il y a formation de sucre réducteur; celui-ci, très abondant les premiers jours, diminue bientôt, à mesure qu'augmente la quantité d'acides formés; dans nos expériences, contrairement à ce qu'a observé l'abbé Maumus, l'amidon ne disparaît pas complètement, le liquide contient encore des résidus colorables en bleu par l'iode. Il est facile de se rendre compte que les portions les plus labiles de l'amidon sont d'abord saccharifiées, puis le sucre est détruit; les portions les plus résistantes de l'empois, celles qui correspondent aux parties les plus cohérentes des granules, ne sont attaquées que plus lentement.

L'acide fixe est, comme le sucre, un terme de transition; il domine dans les premiers temps de l'opération, et on ne le trouve plus ensuite; il correspond à une période d'abondance. Tant que le sucre est en excès, la bactériodie s'arrête dans sa combustion au terme acide lactique; quand le sucre manque, elle attaque celui-ci et finit par le faire disparaître entièrement.

Les nombres de la colonne 4 montrent que l'acide acétique, lui aussi, est brûlé, quand la nourriture devient rare; il disparaît à son tour. On s'expliquerait mal pourquoi le microbe s'attaque ainsi à l'acide lactique et à l'acide acétique, qui représentent certainement pour lui des aliments inférieurs, tandis qu'il reste encore de l'empois non attaqué; mais il y a lieu de rappeler ici les notions introduites dans la science par M. E. Duclaux (7) et par M. le Dr H. Pottevin (8) sur la nature de l'amidon et de l'empois.

L'amidon est composé de portions plus ou moins compactes ; l'empois est son image, et les portions d'amidon qui restent inattaquées après le 5^e jour de culture sont très différentes de celles qui ont été détruites : tandis que les premières étaient d'une saccharification facile, les dernières résistent à l'amylase sécrétée par le ferment et ne se transforment que lentement. C'est pour cela que la bactériodie en est réduite, en attendant, à manger ses restes.

Nous voyons aussi que les propriétés comburantes de la bactériodie sont très énergiques puisque, en fin de compte, elle brûle complètement les aliments hydrocarbonés. Nous reviendrons plus loin sur ce point, et nous montrerons qu'après un temps assez long toute la chaux, qui était primitivement dissoute dans la culture à l'état d'acétate ou de lactate, se retrouve à l'état de carbonate.

Dans le tableau que nous avons donné pour résumer nos expériences, nous avons exprimé l'acide fixe en acide lactique ; c'est qu'en effet celui-ci est le seul acide fixe qui prenne naissance en quantité notable dans les cultures.

EXPÉRIENCE

On a ensemencé 5 fioles contenant chacune :

Bouillon.....	150 c. c.
Fécule.....	7 grammes.
Carbonate de calcium.....	2 ^{gr} ,5

Aubout de trois semaines, on a repris et mélangé le contenu des fioles ; les dosages des acides fixes et volatils ont donné :

Acide fixe (exprimé en acide lactique).....	49 ^{gr} ,03 par litre.
Acide volatil (exprimé en acide acétique)....	5 ^{gr} ,47 —

La moitié du liquide a été évaporée à consistance de sirop, puis additionnée d'une quantité d'acide sulfurique juste suffisante pour précipiter la chaux ; on a fait bouillir et on a filtré. Le liquide filtré a été épuisé par l'éther ; après évaporation de l'éther, il est resté un liquide acide qui, saturé par l'oxyde de zinc, a donné un sel très soluble dans l'eau chaude, peu soluble dans l'eau froide : ce sel, purifié par plusieurs cristallisations, avait au microscope l'aspect caractéristique du lactate de zinc.

Le sel ainsi obtenu a été desséché à l'étuve à 45°, puis chauffé à 140° jusqu'à poids constant : il a perdu ainsi 18,02 0/0 d'eau.

Calciné, il a donné 34 0/0 d'oxyde de zinc; on se trouve donc en présence du lactate de zinc ordinaire (lactate inactif).

Donc, l'acide fixe que nous trouvons au début de la fermentation est de l'acide lactique inactif.

Expériences de M. A. Fernbach. — M. A. Fernbach a étudié l'action de la bactériodie charbonneuse sur la dextrine et sur le maltose.

« Amidon. — Lorsque la bactériodie virulente, puisée dans le sang d'un cobaye qui vient de mourir du charbon, est introduite dans un empois d'amidon additionné de craie et de bouillon dilué (fécule, 10 grammes, craie, 4 grammes; 150 c. c. bouillon de veau 1/3), la liquéfaction de l'amidon est très rapide, et au bout de 24 heures, le liquide ne se colore plus sensiblement par l'iode. Il se produit un acide fixe, acide lactique, et des acides volatils. Au début de la culture, ces acides volatils sont presque exclusivement constitués par de l'acide formique. Au bout de 2 ou 3 jours, cet acide est mélangé d'acide acétique en proportion notable. Ce dernier ne tarde pas à devenir prédominant. Au bout de 5 jours, il ne reste presque plus d'acide formique, et au bout d'un mois on ne trouve plus que de l'acide acétique pur. »

Il y a, entre les résultats obtenus par M. A. Fernbach et les nôtres, une légère divergence qui porte sur la nature de l'acide volatil formé dans les premiers moments de la culture.

Dans la série d'expériences que nous avons rapportée, le premier ballon étudié l'avait été après 5 jours de culture; M. Fernbach trouvant de l'acide formique dès les premières 24 heures, nous avons recommencé nos essais pour étudier la culture plus près de son début.

Nous donnons ci-dessous les nombres fournis par les distillations fractionnées des acides volatils correspondant à ces essais.

AGE DE LA CULTURE		
12 heures.	36 heures.	5 jours.
46,9	41,04	7,4
28,7	20,7	45,4
38,8	28,9	23,1
45,6	37,2	31,2
54,08	46,9	39,8
60,8	55,2	49,07
69,2	64,8	59,8
77,7	74,5	70,2
87,8	86,9	83,01
100,0	100,0	100,0

Les tableaux de distillations fractionnées correspondant aux divers acides purs sont les suivants (9) :

Acide formique.	Acide acétique.	Acide propionique.	Acide butyrique.
5,9	7,4	12,1	17,6
12,2	15,2	24,0	33,6
19,0	23,4	34,3	47,5
26,4	32,0	46,2	60,0
34,4	40,9	56,8	70,6
43,2	50,5	66,7	79,5
52,8	60,9	76,2	86,5
64,6	71,9	85,0	92,5
79,6	84,4	93,0	97,0
100,0	100,0	100,0	100,0

On voit que, dans les premiers jours de la culture, la courbe qui représente les nombres des distillations fractionnées se place entre la courbe de l'acide butyrique et celle de l'acide acétique; elle est d'abord au-dessus de la courbe de l'acide propionique, puis au-dessous, ce qui correspondrait à un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique.

A mesure que la culture se prolonge, l'acide acétique domine; il existe seul à partir du 5^e jour et reste seul pendant plusieurs semaines.

Comme M. Fernbach, nous trouvons que l'acide volatil produit tout au début de la culture disparaît ensuite pour faire place à l'acide acétique; mais, dans nos cultures, cet acide initial n'était pas de l'acide formique. Cette légère divergence entre nos résultats et ceux de M. Fernbach doit, sans aucun doute, être attribuée à ce fait que nous n'avons pas opéré sur la même race de bactériidies.

Bactéridie et bouillon seul. — Dans le bouillon seul, non additionné d'amidon, la bactériidie a donné, dans les mêmes conditions de culture, une petite quantité d'acide volatil, qui a été de l'acide acétique, mélangé, vers la fin, d'un peu d'acide supérieur. La quantité totale d'acide volatil obtenue dans ce cas est toujours très petite par rapport à celle que l'on obtient dans les cultures similaires additionnées d'amidon.

Bactéridie sporogène virulente, atténuée, bactériidie asporogène et amidon. — La bactériidie charbonneuse est un des microbes les plus anciennement et les mieux étudiés; on possède aujourd'hui, dans les laboratoires, diverses races [vaccins (10), charbon

asporogène (11)] qui dérivent de la bactériodie virulente par une filiation simple.

Il y aurait évidemment intérêt, au double point de vue physiologique et pathologique, de savoir à quelle variation dans les fonctions fermentatives se rattachent les variations dans les fonctions sporulatrices ou virulentes. Dans cet ordre d'idées, nous avons cherché comment se comportaient, vis-à-vis de l'amidon, les charbons de différentes espèces, d'une part, les diastases qu'ils sécrètent et au moyen desquelles ils saccharifient l'amidon, d'autre part.

Nous avons préparé comme précédemment un certain nombre de fioles contenant :

Bouillon.....	450 c. c.
Fécule.....	7 grammes.
Carbonate de calcium.....	2 ^{gr} ,5

Ces fioles ont été divisées en 3 séries qui ont étéensemencées simultanément :

1^o Série A, avec bactériodies provenant d'une vieille culture en gélose qui ne tuait plus le cobaye ;

2^o Série B, avec le sang d'un cobaye mort du charbon en 24 heures ;

3^o Série C, avec une culture de charbon asporogène virulent.

Les cultures de ces 3 séries, examinées à intervalles réguliers, ont donné :

DURÉE de la culture.			ESSAI à la liqueur de Fehling.			ACIDE FIXE (évalué en acide lactique)			ACIDE VOLATIL. (évalué en acide acétique,		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
8	8	8	0 réduct.	0 réduct.	1,39 gluc.	2,81	3,45	2,41	0,51	0,65	1,05
»	15	15	»	d°	0 réduct.	»	4,04	3,30	»	1,64	1,71
21	21	21	0 réduct.	d°	d°	3,97	2,08	4,55	1,05	1,82	1,69

Dans les trois cas, on trouve les mêmes acides, et l'allure du phénomène reste la même.

Bactéridie charbonneuse et amidons divers. — Toutes les expériences qui précèdent ont été effectuées avec de l'amidon de pomme de terre. Nous nous sommes demandé si la bactéridie attaquerait dans les mêmes conditions des amidons d'origines différentes, et nous avons essayé les amidons de riz, de froment, de manioc.

Ces amidons ont été ajoutés au bouillon dans les mêmes proportions que l'amidon de pomme de terre.

Dans tous les cas l'acide volatil a été de l'acide acétique.

Le tableau ci-dessous résume ces expériences :

	Durée de la Culture.	Essai à l'iode.	Essai à la liqueur de Fehling.	Acide Fixe (évalué en acide lactique).	Acide Volatil (évalué en acide acétique).
Froment.	46 jours.	Coloration violacée.	Pas de réduction.	4,06	1,82
Manioc ..	14 »	—	—	2,69	0,91
Riz.....	18 »	—	—	4,01	1,27

Avec la dextrine, M. A. Fernbach a vu que celle-ci était d'abord transformée en glucose; le glucose disparaissait à son tour. L'acide formique, formé d'abord, disparaît rapidement; après 24 heures et jusqu'à la fin de la culture on ne trouve plus que de l'acide acétique.

Si nous rapprochons ces résultats de ceux obtenus par M. Roger avec le glycogène, par M. Noé avec l'inuline, nous voyons que la bactéridie trouve un bon aliment dans les matières amylacées les plus diverses, tant animales que végétales.

Nous allons constater qu'elle attaque aussi facilement les sucres.

Bactéridie charbonneuse et sucres. — Nous avons opéré sur le maltose, le glucose, le saccharose.

Pour cela, nous avons préparé des milieux avec :

Bouillon.....	150 c. c.
Sucre.....	4gr,5
Carbonate de calcium	0gr,5

Nous avons pris comme semence une culture virulente sur gélose.

Dans tous les cas, l'acide volatil a été de l'acide acétique.

	Durée de la culture.	Sucre consommé.	Acide Fixe (évalué en acide lactique).	Acide Volatil (évalué en acide acétique).
Glucose	10 jours	—	0,36	0,27
	45 —	1 ^{er} ,22	0,64	0,77
	87 —	1,54	0,74	1,13
Maltose.....	10 —	—	0,70	0,51
	45 —	1,83	0,44	0,94
	87 —	2,45	0,78	1,37
Saccharose	10 —	—	0,50	0,43
	45 —	—	0,72	0,93
	87 —	—	0,44	0,91

Nous voyons en somme que les sucres se comportent comme les amidons ; ils sont détruits, avec formation d'un acide fixe qui n'est lui-même qu'un produit intermédiaire ; cet acide fixe est attaqué à son tour et fait place à de l'acide acétique qui est lui-même détruit en fin de compte.

M. Fernbach a étudié l'action de la bactériidie sur le maltose, en présence de peptone (2 0/0) et craie :

« Le maltose est transformé en glucose sans que la transformation soit jamais intégrale ; l'acide formique persiste bien plus longtemps qu'avec l'amidon : on le retrouve encore, presque pur, après 4 jours. Au 6^e jour, l'acide acétique apparaît ; au 13^e jour, l'acide formique a diminué, mais il en reste encore beaucoup, et il en reste encore après un mois, alors que la consommation du maltose est presque complète. Vers la fin de la culture, le glucose, qu'on trouvait au début, semble avoir entièrement disparu.

« Ce fait semble indiquer que le glucose est gênant ; des expériences de culture sur glucose ont montré que la bactériidie ne le consommait qu'avec une extrême lenteur. »

Bactériidie et lactate de calcium. — Nous avons pensé compléter utilement notre étude en faisant consommer par la bactériidie du lactate de calcium que nous lui offrons en nature.

Nous n'avons pas réussi à obtenir la destruction du lactate de calcium en ensemençant directement la bactériidie dans le bouillon additionné de lactate; nous avons été plus heureuse quand nous avons ajouté le lactate de calcium dans la culture déjà poussée.

Expérience. — Deux litres de bouillon, additionné de 5 grammes de peptone, ont étéensemencés et mis à l'étuve; au bout de 6 jours, la culture étant bien développée, nous avons prélevé avec pureté 100 c. c. du liquide.

Puis, au liquide restant, nous avons ajouté 9^{gr},32 de lactate de calcium en solution dans 150 c. c. d'eau (la solution ayant été stérilisée préalablement).

Les 100 c. c. de culture prélevés ont été saturés de carbonate de calcium, et ont servi à déterminer les acides qui étaient déjà formés au moment de l'addition du lactate de chaux; ils ont donné :

Acide volatil (rapporté à la culture totale)..... 1^{gr},2

Au bout de 3 mois, on a repris la culture et on y a dosé :

1^o La quantité de chaux en solution;

2^o Les acides volatils.

On a trouvé que l'acide volatil était de l'acide acétique et qu'il y en avait 4^{gr},92 dans toute la culture, ce qui correspond à peu près à la quantité (5 grammes) qui serait nécessaire pour saturer la chaux dissoute.

L'acide lactique a donc été à peu près entièrement détruit. Nous en retrouvons une petite quantité sous forme d'acide acétique, mais la plus grande partie a subi une dégradation plus profonde : en effet, le fond des ballons de culture était tapissé par un abondant dépôt. Nous avons recueilli ce dépôt, nous l'avons lavé à l'eau et séché : il pesait 2^{gr},28.

Traité par l'acide acétique, il faisait effervescence; on a ajouté de l'acide acétique jusqu'à dissolution de tout ce qui était soluble : la portion insoluble dans l'acide acétique pesait 0^{gr},16.

Si la portion entrée en solution était du carbonate de calcium, il y en avait (2,28-0,16) 2^{gr},12. Comme contrôle, la solution acétique a été évaporée; le sel séché pèse 2^{gr},42, ce qui est bien le poids d'acétate de calcium correspondant à 2^{gr},12 de carbonate de calcium.

Si donc nous considérons le carbone qui a été mis à la disposition de la bactériodie sous la forme lactate de calcium, nous trouvons qu'il correspondait :

Au début, à 2 ^h ,17 sous forme d'acide lactique.			
	0,43	—	—
A la fin à . . }		—	lactique.
	1,49	—	—
	0,25	—	acétique.
		—	carbonique.

III

AMYLASES DE LA BACTÉRIDIE

Si la bactérie charbonneuse est capable de liquéfier et de saccharifier l'amidon, c'est qu'elle sécrète une amylase. Nous nous sommes proposé d'isoler et d'étudier à part les amylases fournies par les diverses races de bactéridies.

M. le Dr Malfitano (expériences encore inédites), qui avait entrepris une étude analogue sur les diastases protéolytiques de la bactéridie, a bien voulu mettre à notre disposition des macérations de corps de microbes, dont nous nous sommes servis pour nos expériences.

Ces microbes provenaient de cultures sur gélose qui étaient raclées, mises à macérer dans l'eau stérile pendant deux jours, à la température de 35°, puis filtrées à la bougie Chamberland.

Expérience. — Nous avons préparé des tubes contenant chacun 5 c. c. d'empois à 4 0/0 de fécule et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Chacun de ces tubes a reçu les proportions suivantes des diverses solutions diastasiques fraîches ou chauffées :

I.	1 c. c.	diastase active	+	2 c. c.	diastase chauffée.
II.	2	—	—	+	1 — — —
III.	3	—	—	+	0 — — —

Et nous avons 3 séries de ces tubes :

Série A.	Diastases provenant de bactéridies sporogènes virulentes				
Série B.	—	—	—	du 2 ^e vaccin.	
Série C.	—	—	—	du 1 ^{er} vaccin.	

Les macérations de corps de microbes avaient été étendues

d'eau de façon à contenir toutes la même proportion d'extrait sec. Dans ces conditions, les tubes de la série A, par exemple, se trouvent avoir reçu des quantités de diastase provenant de poids égaux de corps microbiens virulents.

Les mélanges diastasifères étaient ajoutés à l'empois non encore totalement refroidi (température 45° à 50°); celui-ci constitue alors une masse demi-fluide à laquelle le liquide ajouté se mélange aisément; après complet refroidissement, le mélange forme un empois solide. On abandonnait à la température de 35°.

Pour éviter l'intervention des infiniment petits, l'eau qui avait servi à faire l'empois, aussi bien que celle qui avait servi pour la macération, était de l'eau saturée de thymol.

Après 24 heures de séjour à l'étuve, le contenu de tous les tubes avait été liquéfié; ceci indiquait qu'il y avait dans toutes les macérations de l'amylase active (des tubes témoins étaient restés inaltérés).

Pour apprécier les quantités d'amylase fournies par des poids égaux de bactériidies virulentes et vaccinales, il n'y avait qu'à mesurer quantitativement l'action produite par leurs macérations. Sans doute, il n'y a pas proportionnalité absolue entre la quantité d'amidon transformé en dextrine en 24 heures et la quantité de diastase agissante; mais on peut admettre, toutes choses égales d'ailleurs, que ces deux quantités varient dans le même sens.

Nous avons donc pris les tubes de la série II et nous avons ajouté à chacun d'eux un volume d'alcool absolu égal au volume de la solution amylacée qu'il contenait; nous avons ainsi précipité les produits de transformation de l'amidon par l'alcool à 50 0/0. Le poids de précipité obtenu dans chaque tube mesure la quantité de substances amylacées qui est encore à l'état de dextrines hautes, insolubles dans l'alcool à 50 0/0; il est en raison inverse de l'activité diastasique de la macération correspondante; nous avons trouvé :

	Amidon total.	Dextrines précipitées par l'alcool à 50 0/0.
Bactéridie virulente.....	0,20	0,44
2 ^{me} vaccin	0,20	0,06
1 ^{er} vaccin.....	0,20	0,05

Nous voyons que la quantité de diastase fournie par la bactérie-

ridie virulente est inférieure à celle que fournissent, — toutes choses égales d'ailleurs, — le 1^{er} et le 2^e vaccin.

M. le Dr Malfitano a trouvé que des poids égaux de bactéries virulentes et de vaccin donnaient, dans les mêmes conditions, des quantités différentes de diastases protéolytiques, la bactérie virulente étant celle qui en donne le plus.

C'est, nous le voyons, le contraire de ce qui se passe pour la diastase amylolytique.

CONCLUSIONS

La bactéridie charbonneuse attaque facilement les matières amylacées et les sucres ; aux dépens de chacun d'eux, elle donne un acide fixe (acide lactique) et un acide volatil qui a été, dans tous les cas, — sauf dans les tout à fait premiers moments de la culture, — de l'acide acétique.

Quand l'aliment hydrocarboné devient rare (sucre) ou difficile à attaquer (amidon), la bactéridie s'attaque à l'acide lactique formé et le consomme en deux temps : elle laisse comme résidu de l'acide acétique qui est lui-même détruit plus tard, si bien que tout le carbone de l'aliment hydrocarboné offert primitivement se trouve ramené à l'état d'acide carbonique.

Au point de vue de leurs propriétés protéolytiques et amylolytiques, la bactéridie virulente et les vaccins qui en dérivent se comportent de façons inverses ; les propriétés protéolytiques dominant chez les espèces virulentes, les propriétés amylolytiques dominant chez les espèces atténuées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dr LOUIS MARTIN, Production de la toxine diphtérique. *Annales Institut Pasteur*, p. 26.
2. Dr ROGER, Glycogénie dans l'infection charbonneuse. *C. R. Ac. Sc.*, 1893, II, 117, p. 488.
3. Dr MARMIER, Sur la toxine charbonneuse. *Annales Institut Pasteur*, 1895, p. 533.
4. Abbé MAUMUS, Transformation de l'amidon végétal en sucre par le bacillus anthracis. *C. R. Soc. Biol.*, 1893, p. 107.
5. M. J. NOÉ, Action de la bactériémie charbonneuse sur l'inuline. *C. R. Soc. Biol.*, 1894, p. 750.
6. 9. M. E. DUCLAUX, Sur le dosage des acides volatils. *Annales Institut Pasteur*, 1895, p. 265.
7. M. E. DUCLAUX, *Microbiologie*, t. II, p. 391 et suivantes.
8. Dr H. POTTEVIN, Saccharification de l'amidon. *Annales Institut Pasteur*, 1899, p. 665.
10. PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX, De l'atténuation des virus et de leur retour à la virulence. *Ac. des Sciences*, 28 février 1881.
- PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX, Le vaccin du charbon. *Ac. des Sciences*, 21 mars 1881.
11. Dr E. ROUX, Bactériémie charbonneuse asporogène. *Annales Institut Pasteur*, 1890, p. 25.

Vu, le président de la thèse,
ÉMILE BOURQUELOT.

Vu, le directeur de l'école,
G. PLANCHON.

Vu et permis d'imprimer,
Le vice-recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

